

## ヘパリン純度試験に関する研究 (第1報)

<sup>1</sup>H-NMRによるヘパリンナトリウム純度試験に関する研究

橋井 則貴\*<sup>1</sup>, 川崎 ナナ\*<sup>1</sup>, 高倉 大輔\*<sup>1</sup>, 伊藤さつき\*<sup>1</sup>, 川原 信夫\*<sup>2</sup>,  
 正田 卓司\*<sup>3</sup>, 杉本 直樹\*<sup>4</sup>, 薮島 由二\*<sup>5</sup>, 品川 麻衣\*<sup>6</sup>, 榛葉 信久\*<sup>6</sup>,  
 宮田 一義\*<sup>7</sup>, 塚本 秀樹\*<sup>8</sup>, 千秋 和久\*<sup>8</sup>, 長谷川泰介\*<sup>9</sup>, 河合 健蔵\*<sup>10</sup>,  
 余田 光\*<sup>10</sup>, 木下 充弘\*<sup>11</sup>, 掛樋 一晃\*<sup>11</sup>, 合田 幸広\*<sup>2</sup>, 奥田 晴宏\*<sup>3</sup>,  
 棚元 憲一\*<sup>4</sup>, 山口 照英\*<sup>1</sup>

(受付:平成20年8月14日, 受理:平成20年9月22日)

## Studies on the Heparin Purity Test (Part 1)

Study on the Heparin Sodium Purity Test by <sup>1</sup>H-NMR

Noritaka HASHII\*<sup>1</sup>, Nana KAWASAKI\*<sup>1</sup>, Daisuke TAKAKURA\*<sup>1</sup>, Satsuki ITOH\*<sup>1</sup>,  
 Nobuo KAWAHARA\*<sup>2</sup>, Takuji SHODA\*<sup>3</sup>, Naoki SUGIMOTO\*<sup>4</sup>, Yuji HAISHIMA\*<sup>5</sup>,  
 Mai SHINAGAWA\*<sup>6</sup>, Nobuhisa SHIMBA\*<sup>6</sup>, Kazuyoshi MIYATA\*<sup>7</sup>,  
 Hideki TSUKAMOTO\*<sup>8</sup>, Kazuhisa SENSHU\*<sup>8</sup>, Taisuke HASEGAWA\*<sup>9</sup>, Kenzo KAWAI\*<sup>10</sup>,  
 Hikaru YODEN\*<sup>10</sup>, Mitsuhiro KINOSHITA\*<sup>11</sup>, Kazuaki KAKEHI\*<sup>11</sup>, Yukihiro GODA\*<sup>2</sup>,  
 Haruhiro OKUDA\*<sup>3</sup>, Kenichi TANAMOTO\*<sup>4</sup> and Teruhide YAMAGUCHI\*<sup>1</sup>

## 緒 言

ヘパリンナトリウムは、健康な食肉獣、主にブタの腸から得られる硫酸化グリコサミノグリカンのナトリウム塩で、ウロン酸 (L-イズロン酸又はD-グルクロン酸) 及びグルコサミン (GlcN) の2糖繰り返し構造に平均2~2.5個の硫酸エステル基が結合した構造からなる (Fig. 1A)。ヘパリンナトリウムは、血液透析その他の体外循環装置使用時の抗凝固剤として世界中で用いられており、日本薬局方をはじめ、米国薬局方や欧州薬局方に収載されている。また、デルテパリンナトリウム、バルナパリンナトリウム、レビパリンナトリウム、エノキサパリンナトリウムなどの低分子量ヘパリンの原料としても使用されている。

2007年11月以降米国及びドイツにおいて、ヘパリンナトリウムの静脈急速大量投与による血管性浮腫、血圧低下、頻脈、蕁麻疹、及び悪心等を伴う急

性炎症反応の事例が頻発し、2008年4月までに81名の患者の死亡が報告された。米国食品医薬品局 (FDA) は2008年3月に急性炎症反応の原因物質として、ヘパリンナトリウムに混入していた過硫酸化コンドロイチン硫酸 (over-sulfated chondroitin sulfate; OSCS) を特定した<sup>1)</sup>。天然に存在するコンドロイチン硫酸エステルは、グルクロン酸とN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) の2糖単位に硫酸エステル基が1~3個結合した多糖類であるが<sup>2)</sup>、混入していたOSCSは、4つの水酸基がすべて硫酸エステル化された非天然型のコンドロイチン硫酸エステルであった (Fig. 1B)<sup>3-5)</sup>。その後、有害事象を引き起こしたヘパリンナトリウムには、OSCS以外に、デルマタン硫酸 (DS:別名、コンドロイチン硫酸エステルB) (Fig. 1C)、たん白質及び低分子量物質等も、従来の製品より多く含まれていることが明かにされた。

FDAは原因物質としてOSCSを特定したことを

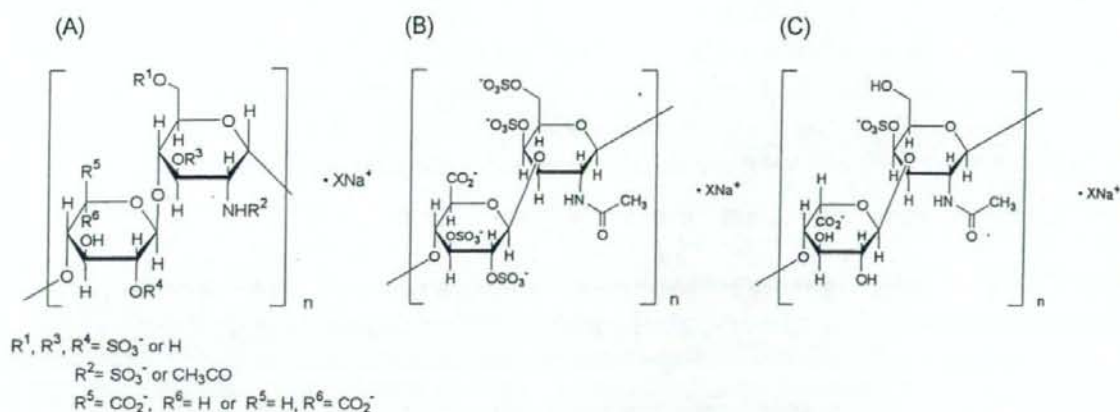


Fig. 1 (A) ヘパリンナトリウム, (B) OSCS 及び (C) DS

公表すると前後して<sup>1)</sup>, <sup>1</sup>H-核磁気共鳴スペクトル (NMR) とキャピラリー電気泳動法を用いた不純

物検出法をウェブサイト公開した<sup>2)</sup>. <sup>1</sup>H-NMR は、ヘパリンの *N*-アセチルグルコサミン (Glc-

- <sup>\*1</sup> 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)  
 Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1  
 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan
- <sup>\*2</sup> 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 同上  
 Division of Pharmacognosy, Photochemistry and Narcotics
- <sup>\*3</sup> 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部 同上  
 Division of Organic Chemistry
- <sup>\*4</sup> 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部 同上  
 Division of Food Additives
- <sup>\*5</sup> 国立医薬品食品衛生研究所療品部 同上  
 Division of Medical Devices
- <sup>\*6</sup> 味の素㈱ライフサイエンス研究所 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1-1 (〒210-8681)  
 Institute of Life Sciences, Ajinomoto Co., 1-1 Suzuki-cho, Kawasaki-ku, Kawasaki, Kanagawa 210-  
 8681, Japan
- <sup>\*7</sup> ㈱大塚製薬工場 徳島県鳴門市撫養町立岩字芥原 115 (〒772-8601)  
 Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc., 115 Kuguhara, Tateiwa, Muya-cho, Naruto, Tokushima 772-  
 8601, Japan
- <sup>\*8</sup> テルモ㈱評価センター 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口 1500 (〒259-0151)  
 Evaluation Center, Terumo Co., 1500, Inokuchi, Nakai-machi, Ashigarakami-gun, Kanagawa, 259-  
 0151, Japan
- <sup>\*9</sup> 日本臓器製薬㈱生物活性科学研究所 兵庫県加東市木梨川北山 442-1 (〒673-1461)  
 Institute of Bio-Active Science, Nippon Zoki Pharmaceutical Co., 442-1 Kawakitayama, Kinashi,  
 Kato, Hyogo 673-1461, Japan
- <sup>\*10</sup> 扶桑薬品工業㈱研究開発センター 大阪市城東区森之宮 2-3-30 (〒536-8523)  
 Research and Development Center, Fuso Pharmaceutical Industries, 2-3-30 Morinomiya, Joto-ku,  
 Osaka 536-8523, Japan
- <sup>\*11</sup> 近畿大学薬学部 東大阪市小若江 3-4-1 (〒577-8502)  
 School of Pharmacy, Kinki University, 3-4-1 Kowakae, Higashi-Osaka, Osaka 577-8502, Japan
- Corresponding author: Nana Kawasaki, Division of Biological Chemistry and Biologicals, National  
 Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan  
 E-mail: nana@nih.go.jp

NAc)のN-アセチル基とOSCSのGalNAcのN-アセチル基の化学シフトの違いを利用した方法であり、キャピラリー電気泳動法は、ヘパリンとOSCSが硫酸基結合数の違いで分離されることを利用した方法である。各国は、FDAが公開した分析法を用いてヘパリンナトリウムの分析を行うとともに、OSCSの存在が確認されたヘパリンナトリウムの回収を行う等の対応をとった。一方で、世界的にヘパリン関連医薬品の供給不足への懸念が広がり、ヘパリンナトリウム製剤の安定供給のために、OSCSやDS分析法の整備が緊急課題となった。日本薬局方、米国薬局方及び欧州薬局方も、迅速対応として、ヘパリンナトリウム各条にOSCS及びDSの試験を追加することを検討するに至った<sup>6,7)</sup>。

本研究は、我が国におけるヘパリンナトリウムの品質・安全性確保を目的として、FDAの方法を参考に、<sup>1</sup>H-NMRによるOSCS及びDS分析法を確立するとともに、日本薬局方各条ヘパリンナトリウム純度試験としての適用可能性を評価したものである。

## 実験方法

### 1. 試料

OSCSは日本バルク薬品㈱から供与されたヘパリンナトリウムより弱陰イオン交換HPLCで精製したものをを用いた<sup>8)</sup>。DSは生化学工業㈱から購入した。日局ヘパリンナトリウム標準品は動日本公定書協会より供与された。国立衛研は、ニプロファーマ㈱より供与されたヘパリンナトリウムを用いた。共同検定に参加した製薬企業5社は、各社のヘパリンナトリウムを使用した。3-トリメチルシリルプロピオン酸ナトリウム-d<sub>4</sub> (TSP, 重水素化率98%)は、アルドリッチ社から購入した。重水は重水素化率99.9~99.96%のものを使用した。

### 2. 分析条件

ヘパリンナトリウム20mgを最終濃度0.01% (w/v) TSPを含む重水溶液 (TSP重水溶液) 0.60 mLに溶かして試料溶液とした。この液につきTSPを内部基準物質として日本薬局方一般試験法NMR (2.21) に従い<sup>1</sup>H-NMRを測定した。温度は25℃に設定し、スピニングはオフとした。データポイント数は32,768とし、スペクトル範囲はDHOのシグナルを中心に±6.0 ppmとした。パル

ス角は90°、繰り返しパルス待ち時間は20秒、ダミーキャンは4回とした。ヘパリンのN-アセチル基のプロトンのシグナルのS/N比200以上が得られるまで積算した。ウィンドウ関数は指数関数 (Line broadening factor=0.2 Hz) を用いた。

### 3. 分析能パラメータの評価及びデカップリングによる<sup>13</sup>C サテライトピーク消失の確認

分析能パラメータの評価は、国立衛研においてJEOL JNM-ECA 500 (500 MHz) を用いて実施した。ピーク面積は、ピーク形状を補正処理した後、TSPのピークのシグナル面積強度を1.000としたときの相対面積強度として算出した。デカップリングによる<sup>13</sup>C サテライトピーク消失の確認は、JEOL JNM-ECA 600 (600 MHz) を用いて行った。

#### 3.1 OSCS

ヘパリンナトリウムをTSP重水溶液に溶解してヘパリンナトリウムTSP重水溶液とした (20 mg/0.6 mL)。この液に最終濃度0.17~10.0% (w/w) になるようにOSCSを添加した後、500 MHzの装置を用いて<sup>1</sup>H-NMRを測定した。TSPのシグナル面積強度に対するOSCSのN-アセチル基に由来するシグナルの相対面積強度を求めた。

#### 3.2 DS

ヘパリンナトリウムTSP重水溶液 (20 mg/0.6 mL) に最終濃度0.35~18.7% (w/w) となるようDSを添加した後、500 MHzの装置を用いて<sup>1</sup>H-NMRを測定した。TSPのシグナル面積強度に対するDSのN-アセチル基に由来するシグナルの相対面積強度を求めた。

### 4. 共同検定

国立衛研生物薬品部、同有機化学部、味の素㈱、㈱大塚製薬工場、テルモ㈱、日本臓器製薬㈱、及び扶桑薬品工業㈱が参加した。ここでは便宜上試験室A~Gと記す (順不同)。試験室AはBruker AVANCE 600 (600 MHz)、試験室BはBruker ARX-500 (500 MHz)、試験室CはVarian INOVA 500 (500 MHz)、試験室DはJEOL JNM-ECA 500 (500 MHz)、試験室EはJEOL JNM-AL 400 (400 MHz)、試験室FはVarian MERCURY VX 400 (400 MHz)、試験室GはVarian Unity-Plus 400 (400 MHz) を使用した。

#### 4.1 OSCS

OSCSをTSP重水試液に溶解し、OSCS溶液(4.0 mg/mL)を調製した。この液とヘパリンナトリウムTSP重水溶液を用いて、最終濃度0.5、1.0及び1.5% (w/w)のOSCSを含むヘパリンナトリウムTSP重水溶液(20 mg/0.6 mL)を調製し、<sup>1</sup>H-NMRを測定した。3.1と同様にしてTSPのシグナル面積強度に対するOSCSのN-アセチル基に由来するシグナルの面積強度比を求めた。

#### 4.2 DS

DSをTSP重水試液に溶解し、DS溶液(4.0 mg/mL)を調製した。この液とヘパリンナトリウムTSP重水溶液を用いて、最終濃度1.0、1.5及び2.0% (w/w)のDSを含むヘパリンナトリウム溶液(20 mg/0.6 mL)を調製した。3.2と同様にしてTSPのシグナル面積強度に対するDSのN-アセチル基に由来するシグナルの相対面積強度を求めた。

### 結 果

#### 1. OSCSの分析

##### 1.1 特異性

ヘパリンナトリウムをTSP重水溶液に溶かして20 mg/0.6 mLの試料溶液(ヘパリンナトリウムTSP重水溶液)を調製し、プロトン共鳴周波数500 MHzのNMR装置を用いて<sup>1</sup>H-NMRを測定したところ、ヘパリンナトリウムのN-アセチル基のプロトンは2.05 ppmに観測された。次に、ヘパリンナトリウムTSP重水溶液に最終濃度10.0% (w/w)になるようにOSCSを添加して<sup>1</sup>H-NMRを測定したところ、OSCSに由来するN-アセチル基のシグナルは、2.15 ppmに観測された(Fig. 2)。ヘパリンとOSCSのN-アセチル基のシグナルはよく分離していることから、<sup>1</sup>H-NMRは、OSCSに対する特異性が高いことが確認された。また、ヘパリンナトリウムのN-アセチル基の<sup>13</sup>Cサテライトピークのうち低磁場側のピークが2.175 ppmに観測されたが、OSCSのN-アセチル基のプロトンシグナルの化学シフトは2.152 ppmであり、識別できることが確認された。

プロトン共鳴周波数600 MHz装置を用いたとき、ヘパリンナトリウムのN-アセチル基の<sup>13</sup>Cサテライトピークが1.937及び2.151 ppmに観測された(Fig. 3A)。ヘパリンナトリウムにOSCSを添加し

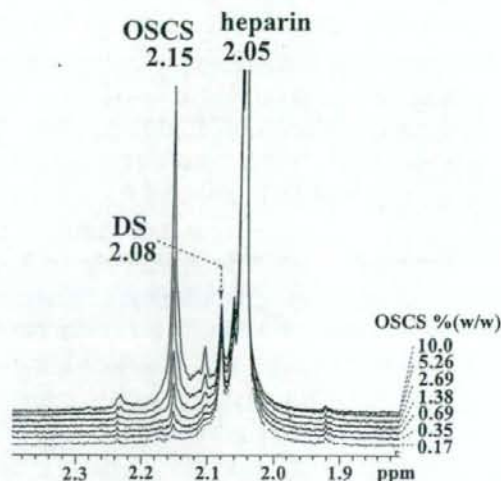


Fig. 2 ヘパリンナトリウム及びOSCSのN-アセチル基のプロトンの化学シフト  
最終濃度0.17~10.0% (w/w)のOSCSをヘパリンナトリウムに添加した。プロトン共鳴周波数: 500 MHz.

て<sup>1</sup>H-NMRを測定すると、低磁場側の<sup>13</sup>CサテライトピークがOSCSのN-アセチル基のプロトンシグナルと重なることが明らかとなった(Fig. 3B)。しかし、デカップリングにより<sup>13</sup>Cサテライトピークを消失させることによって、OSCSのみを検出できることが確認された(Fig. 3C)。

##### 1.2 検出限界

OSCSを最終濃度0.17~10.0% (w/w)になるようにヘパリンナトリウムTSP重水溶液に添加した溶液につき<sup>1</sup>H-NMRを測定し、本分析法の検出限界を確認した。Fig. 2に示すように、OSCS濃度が0.35%のときにはピークを確認することができたが、OSCS濃度が0.17%のときはピークとして判断することが困難であった。

##### 1.3 直線性、範囲、再現性

OSCSを最終濃度0.17~10.0% (w/w)になるように添加したヘパリンナトリウムTSP重水溶液につき、<sup>1</sup>H-NMRを測定した。得られたOSCSのN-アセチル基に由来するシグナル面積強度をTSPに対する面積強度比で表したとき、0.4~10.0%の範囲で直線性が確認され、その相関係数( $R^2$ )は0.9991であった(Fig. 4)。0.4%のOSCSを添加したときの併行精度は1.6%であった。また、0.4%の

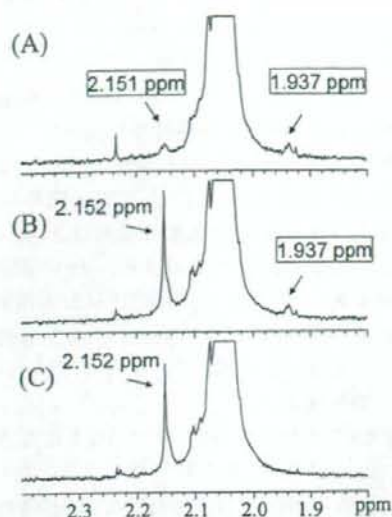


Fig. 3 ヘパリンナトリウム *N*-アセチル基のプロトン由来 <sup>13</sup>C-サテライトピーク (1.937 及び 2.151 ppm), 及び OSCS の *N*-アセチル基のプロトンのシグナル (2.152 ppm)

装置：JEOL JNM-ECA600 (600 MHz). (A) ヘパリンナトリウムのみ (デカップリングなし), (B) 最終濃度 1.0% (w/w) OSCS 添加ヘパリンナトリウム (デカップリングなし), 及び (C) 最終濃度 1.0% (w/w) OSCS 添加ヘパリンナトリウム (デカップリングあり).

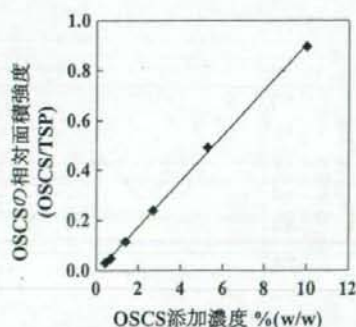


Fig. 4 <sup>1</sup>H-NMRによるOSCSの直線性  
ヘパリンナトリウムに最終濃度 0.17~10.0% (w/w) のOSCSを添加したときのTSPのシグナル面積強度に対するOSCSの*N*-アセチル基のプロトンの相対面積強度をプロットした。

Table 1 <sup>1</sup>H-NMRによるOSCS分析の分析能パラメータ

分析能パラメータ	結果
真度 <sup>a</sup>	98.3 % (RSD : 4.63%)
併行精度 <sup>a</sup>	1.6%
特異性	Fig.2 参照
検出限界	0.35 %
定量限界	0.4 %
直線性	Y=0.0909X-0.064 (R <sup>2</sup> =0.9991)
範囲	Fig.4 参照 0.4-10.0 %

<sup>a</sup>0.4%OSCSを用いた(n=3).

OSCSを添加したときの回収率は98.3% (RSD: 4.63%)であった (Table 1).

#### 1.4 共同検定

6機関7試験室において、OSCSを最終濃度 0.5, 1.0 及び 1.5% (w/w) になるようにヘパリンナトリウム TSP 重水溶液に添加し、プロトン共鳴周波数 400, 500 及び 600 MHz の装置を用いて <sup>1</sup>H-NMR を測定した。OSCS の *N*-アセチル基に由来するシグナルは、2.149~2.153 ppm の範囲に観察された。各試験室で得られた TSP に対する OSCP

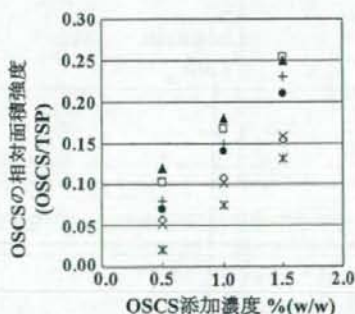


Fig. 5 <sup>1</sup>H-NMRを用いたOSCS限度試験共同検定結果

ヘパリンナトリウムに 0.5, 1.0, 1.5% (w/w) を添加したときの TSP のシグナル面積強度に対する OSCP の *N*-アセチル基のプロトンの相対面積強度。◇, 試験室 A; □, 試験室 B; ▲, 試験室 C; ×, 試験室 D; \*, 試験室 E; ●, 試験室 F; +, 試験室 G

の *N*-アセチル基の相対シグナル面積強度を Fig. 5 に示す。全試験室で0.5%以上の OSCS のシグナルを確認することができたが、一部の試験室では、これ以下の OSCS のシグナルを検出することは難しいと判断された。共同検定結果から、本分析法の検出限界は0.5%程度と判断された。共同検定においても、600 MHz の装置を用いた試験室では、<sup>13</sup>C サテライトピークの一部と OSCS の *N*-アセチル基のシグナルが重なることを確認した。

## 2. DS の分析

### 2.1 特異性

DS を最終濃度 18.7% (w/w) になるようにヘパリンナトリウム TSP 重水溶液に添加し、500 MHz の装置を用いて <sup>1</sup>H-NMR を測定した。DS の *N*-アセチル基の化学シフトは 2.08 ppm であり、ヘパリンナトリウムの *N*-アセチル基 (化学シフト: 2.05 ppm) と一部重なることが確認された (Fig. 6)。

### 2.2 検出限界

DS を最終濃度 0.35~18.7% (w/w) になるようにヘパリンナトリウム TSP 重水溶液に添加した溶液を調製し、500 MHz の装置を用いて <sup>1</sup>H-NMR

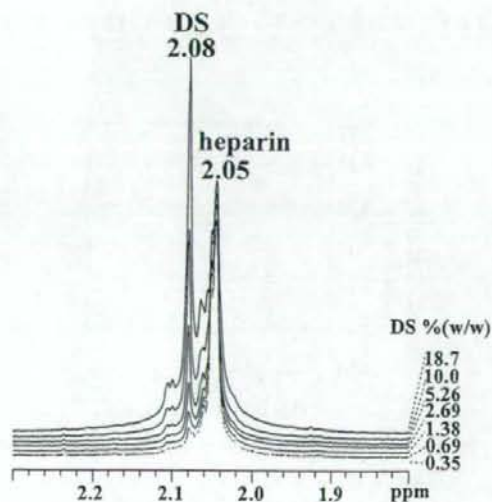


Fig. 6 ヘパリンナトリウム及びDSの *N*-アセチル基のプロトンの化学シフト

0.35~18.7% (w/w) の OSCS をヘパリンナトリウムに添加した、プロトン共鳴周波数: 500 MHz.

を測定したとき、0.35%のDSのシグナルを確認することができた。しかし、それより低い濃度のDSの検出は難しいと思われた (Fig. 6)。

### 2.3 直線性, 範囲, 再現性

500 MHz の装置及びピーク形状補正が可能なソフトウェアを用いて、最終濃度 0.35~18.7% (w/w) のDSを添加したヘパリンナトリウム溶液の <sup>1</sup>H-NMR を測定し、DSのシグナル面積強度をTSPに対する相対面積強度で表したとき、0.6~18.7%の範囲で直線性が確認され、その相関係数は0.9998であった (Fig. 7)。0.6%のDSを添加したときの併行精度は1.5%であった。添加回収率は102.6% (RSD: 3.99%) であった (Table 2)。

### 2.4 共同検定

6機関7試験室において、最終濃度1.0, 1.5及び2.0% (w/w) のDSを添加したヘパリンナトリウム試料溶液の <sup>1</sup>H-NMR を測定し、TSPに対するDSの *N*-アセチル基の相対シグナル面積強度を求めた (Fig. 8)。500 MHz 以上の装置とピーク形状補正が可能なソフトウェアを用いた試験室では、直線性を確認することができた (試験室 A, C 及び D)。しかし、500 MHz の装置を用いても、ピーク形状補正可能なソフトウェアを使用しない場合、DSのシグナルがヘパリンのシグナルと重なっているため、DSの濃度が見かけ上多く算出されることが明らかとなった。また、400 MHz の装置を用いた試験室では、ヘパリンナトリウムの *N*-アセチル基

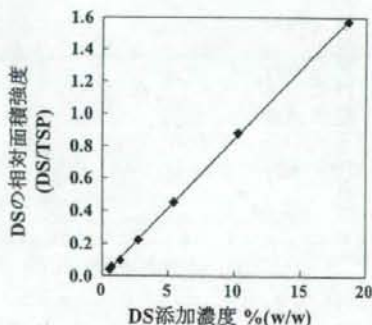


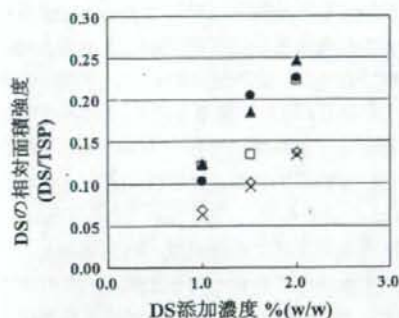
Fig. 7 <sup>1</sup>H-NMRによるDSの直線性

ヘパリンナトリウムに0.35~18.7% (w/w) のDSを添加したときのTSPのシグナル面積強度に対するDSの *N*-アセチル基のプロトンの相対面積強度をプロットした。

Table 2 <sup>1</sup>H-NMRによるDS分析の分析能パラメータ

分析能パラメータ	結果
真度*	102.6% (RSD: 3.99%)
併行精度*	1.5%
特異性	Fig. 6 参照
検出限界	0.35%
定量限界	0.6%
	$Y=0.08534X-0.0113$
直線性	( $R^2=0.9998$ ) Fig. 7 参照
範囲	0.6-18.7%

\*0.6%DSを用いた(n=3).

Fig. 8 <sup>1</sup>H-NMRを用いたDS限度試験共同検定結果

ヘパリンナトリウムに1.0, 1.5, 2.0% (w/w) 添加したときのTSPのシグナル面積強度に対するDSのN-アセチル基のプロトンの相対面積強度。◇, 試験室A; □, 試験室B; ▲, 試験室C; ×, 試験室D; \*, 試験室E; ●, 試験室F; +, 試験室G

とDSのN-アセチル基を分離することができなかった。

## 考 察

### 1. OSCS

<sup>1</sup>H-NMRを用いた分析法は、OSCSに対する特異性が高いこと、また共同検定に参加したすべての機関において、検出限界に近い0.5% (w/w) のOSCSを検出できたことから、ヘパリンナトリウムに混入しているOSCSを対象とした純度試験とし

て、日本薬局方各条に採用することが可能であると判断された。本分析法を用いたときの規格等は以下のように考察された。

#### 1.1 化学シフト

国内6機関7試験室において、OSCSのN-アセチル基は2.149~2.153 ppmに観察されたことから、化学シフトの規格は、2.15 ppmを中心に±0.02 ppmと設定することが適当であると判断された。なお、米国薬局方は、OSCSのN-アセチル基の化学シフトの規格として2.16±0.03 ppmと設定しているが、2008年3月6日に公表された米国FDAのヘパリンナトリウム中の不純物検出法では、2.15±0.02 ppmが採用されている。

#### 1.2 限度値

OSCSは、有害事象の原因物質であること、また、製造工程由来物質や目的物質関連物質として混入する可能性がないことから、ヘパリンナトリウム中に検出されるべきではない。したがって、本試験法における規格は、「ヘパリンナトリウム中にOSCSのN-アセチル基に由来するシグナルが検出されないこと」が適当であると考えられる。ただし、共同検定で得られた本試験法の検出限界は0.5%であることから、本試験法は、0.5%程度の限度試験であり、OSCSの含量が0.5%以下であることを保証するものと解釈される。OSCSをより高感度で測定できる試験機関において、2.15±0.02 ppmの範囲にシグナルが観察された場合、そのシグナルの面積強度が0.5%以下に相当すると推定されても、その検体は規格に適合しないと判断すべきと考えられる。

#### 1.3 システム適合性

本試験法は0.5%程度の限度試験であるので、システム適合性において、OSCSの化学シフトだけでなく、分析システムが0.5%のOSCSを検出できることを確認することが重要である。すなわち、0.1 mg/0.6 mLのOSCSが溶解したTSP含有重水溶液に、約20 mgのヘパリンナトリウム試薬を溶解して<sup>1</sup>H-NMRを測定したとき、2.02~2.06 ppm及び2.13~2.17 ppmにそれぞれヘパリンとOSCSのN-アセチル基に由来するシグナルが検出されることを確認する必要がある。ここで使用するヘパリンナトリウム試薬は、OSCSが混入していないことを確認したものに限られる。なお、国立衛研によって、日局ヘパリンナトリウム標準品中のOSCSが

検出限界未満であることが確認されているので、日局ヘパリンナトリウム標準品を用いてOSCSが混入していないことを確認した後、そのヘパリンナトリウムをヘパリンナトリウム試薬として用いることは可能である。

#### 1.4 <sup>13</sup>C サテライトピーク

<sup>1</sup>H-NMR スペクトルでは、プロトンとカーボンが直接結合している場合、<sup>1</sup>Hと<sup>13</sup>C(天然存在比、約1.1%)のカップリングにより、プロトンのメインピークの両側に2本の<sup>13</sup>Cサテライトピークが観測される。両サテライトピークの化学シフトの間隔(ppm)は[<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>Cのカップリング定数(Hz)/<sup>1</sup>H共鳴周波数(MHz)]で決まることから、ヘパリンのN-アセチル基のプロトンが2.04 ppmに観測される場合、400、500及び600 MHzの装置を使用したときの低磁場側の<sup>13</sup>Cサテライトピークは、それぞれ2.20、2.17、及び2.15 ppmに観測されることになる(N-アセチル基のプロトンの<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>Cカップリング定数：約130 Hz)<sup>9)</sup>。今回の共同研究でも、600 MHzの装置を用いた場合、<sup>13</sup>CサテライトピークがOSCSのN-アセチル基のプロトンシグナルとほぼ同じ位置に観測されることが確認された。しかし、<sup>13</sup>Cサテライトピークは、ヘパリンナトリウムのN-アセチル基のメインピークを中心として対称に観察されること、ヘパリンナトリウムのN-アセチル基に対するシグナル面積強度の0.55%であること、また、デカップリングによって消失することから<sup>9)</sup>、OSCS由来のシグナルと識別可能であると思われる。<sup>13</sup>Cサテライトピークの可能性があるシグナルが2.13~2.17 ppmに検出された場合、デカップリングなどにより、OSCSか<sup>13</sup>Cサテライトピークかを確認する必要がある。

#### 1.5 装置の適用範囲

米国薬局方では500 MHz以上の装置が採用されているが、国内6機関7試験室による共同検定の結果、400 MHzの装置でもOSCSとヘパリンのシグナルを分離できること(同程度の特異性)、並びに0.5%以上のOSCSを検出できること(同程度の検出限界)が確認された。また、400 MHzの装置を所有している国内メーカーが多いことから、日本薬局方のヘパリンナトリウム純度試験では400 MHz以上の装置を採用することが適当であると考えられる。欧州薬局方も400 MHzのNMRの使用を認めてい

る。本研究では、プロトン共鳴周波数300 MHz以下の装置の適用可能性を評価していないので、300 MHz以下の装置を使用する場合は、今回と同様なバリデーションスタディを実施しなければならない。その結果、同程度の特異性と検出限界が確認できれば、OSCS分析法として用いることは可能である。なお、最終的な判断が必要となった場合は、400 MHz以上の装置を用いる必要がある。

## 2. DS

500 MHzの装置を用いた分析能パラメータ評価では、DSとヘパリンの識別が可能であること、また、0.6~18.7% (w/w)の範囲で直線性があることが確認された。しかし、ピーク形状補正を行わない場合や、400 MHzの装置を用いた場合は、定量性や特異性に問題があることが明らかになった。共同検定の結果から、NMRによるDS分析を日本薬局方の試験法として設定することは適当ではないと判断されるが、各機関において、プロトン共鳴周波数500 MHz以上の装置を用い、ピーク形状補正が可能なソフトウェアを用いた場合は、DSの定量試験として利用することは可能であると考えられる。

DSの規制の必要性については、DSはヘパリンとは異なる物質であるので、純度試験として適切に規制するべきであるとする意見と、これまで毒性等の報告がないので、必ずしも純度試験等により規制する必要はないとの意見があり、国際的にも見解が分かれている。今後、国内ヘパリンナトリウムのDSの混入状況について正確に把握した上で、規制が必要か否か検討していく必要がある。その結果、必要と判断された場合は、FDAが提案しているキャピラリー電気泳動法などのNMR以外の方法を日本薬局方における純度試験法として設定する必要があるだろう。

## 謝 辞

有益なご助言をいただきました自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター生命環境研究領域、生命分子研究部門加藤晃一教授、国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部鹿庭なほ子室長、独立行政法人医薬品医療機器総合機構早川堯夫顧問及び小嶋茂雄顧問、ヘパリンナトリウムをご供与いただきました日本バルク薬品(株)及びニプロファーマ(株)並



びに日局ヘパリンナトリウム標準品をご供与いただきました。日本公定書協会に深く御礼申し上げます。本研究の遂行にご協力いただきました厚生労働省医薬食品局審査管理課鷺田淳専門官、鈴木克之主査、独立行政法人医薬品医療機器総合機構品質管理部基準課上野清美課長、森田収氏、仁後知子氏に感謝いたします。また、有益なご討論をいただいた日本薬局方部会、日本薬局方原案審議委員会生物薬品委員会、FDA、米国薬局方、欧州薬局方、及びヘパリンナトリウム製剤製造会社の関係各位にお礼申し上げます。

本研究の一部は厚生労働省の支援によって行われたものである。

#### 文 献

- 1) <http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/heparin/default.htm>.
- 2) Sugahara, K., Yamada, S.: *Trends in Glycoscience and Glycorechnology*, 12, 321-349 (2000).
- 3) Guerrini, M., Beccati, D., Shriver, Z., et al.: *Nat Biotechnol.*, 26(6), 669-675 (2008).
- 4) Kishimoto, T. K., Viswanathan, K., Ganguly, T., et al.: *N. Engl. J. Med.*, 358(23), 2457-2467 (2008).
- 5) Maruyama, T., Toida, T., Imanari, T., Yu, G., Linhardt, R. J.: *Carbohydr. Res.*, 306(1-2), 35-43 (1998).
- 6) <http://www.usp.org/hottopics/heparin.html>.
- 7) [http://www.edqm.eu/medias/fichiers/Heparin\\_sodium\\_monograph\\_Revised.pdf](http://www.edqm.eu/medias/fichiers/Heparin_sodium_monograph_Revised.pdf).
- 8) Montgomery, R. I., Lidholt, K., Flay, N. W., Liang, J., Vertel, B., Lindahl, U., Esko, J. D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 89(23), 11327-11331 (1992).
- 9) Yamaguchi, H., Shinagawa, M., Shimba, N., Miyano, H., Suzuki, E.: *Yakugaku Zasshi*, 128(10), 1513-1515 (2008).

## ヘパリン純度試験に関する研究 (第2報)

<sup>1</sup>H-NMRによるヘパリンカルシウム純度試験に関する研究

橋井 則貴<sup>\*1</sup>, 川崎 ナナ<sup>\*1</sup>, 高倉 大輔<sup>\*1</sup>, 伊藤さつき<sup>\*1</sup>,  
 福原 潔<sup>\*2</sup>, 品川 麻衣<sup>\*3</sup>, 榛葉 信久<sup>\*3</sup>, 有村 雅敏<sup>\*4</sup>,  
 辰巳 昌史<sup>\*4</sup>, 奥田 晴宏<sup>\*2</sup>, 山口 照英<sup>\*1</sup>

(受付:平成20年8月14日, 受理:平成20年9月22日)

## Studies on the Heparin Purity Test (Part 2)

Study on the Heparin Calcium Purity Test by <sup>1</sup>H-NMR

Noritaka HASHII<sup>\*1</sup>, Nana KAWASAKI<sup>\*1</sup>, Daisuke TAKAKURA<sup>\*1</sup>, Satsuki ITOH<sup>\*1</sup>,  
 Kiyoshi FUKUHARA<sup>\*2</sup>, Mai SHINAGAWA<sup>\*3</sup>, Nobuhisa SHIMBA<sup>\*3</sup>,  
 Masatoshi ARIMURA<sup>\*4</sup>, Masashi TATSUMI<sup>\*4</sup>,  
 Haruhiro OKUDA<sup>\*2</sup> and Teruhide YAMAGUCHI<sup>\*1</sup>

## 緒 言

ヘパリンカルシウムは、健康なブタの腸から得られるグリコサミノグリカンのカルシウム塩で、ウロン酸 (L-イズロン酸又はD-グルクロン酸) とD-グルコサミンの2糖単位に硫酸エステル基が2~2.5個結合した構造をもつ (Fig. 1A)。抗凝固活性を有し、血液体外循環時における灌流血液の凝固防止 (人工腎臓及び人工心肺等)、汎発性血管内血液凝固症候群の治療、血管カテーテル挿入時の血液凝固の防止、輸血及び血液検査の際の血液凝固の防止、血

栓塞症 (静脈血栓症, 心筋梗塞症, 肺塞栓症, 脳塞栓症, 四肢動脈血栓塞栓症, 手術中・術後の血栓塞栓症等) の治療及び予防に適応されている。ヘパリンカルシウムは、米国薬局方及び欧州薬局方に収載されているが、我が国においては日本薬局方外医薬品規格2002 (局外規) 収載品目であり、今後日本薬局方第15改正第二追補への収載が予定されている。

2007年11月以降米国及びドイツにおいて、ヘパリンナトリウムを急速大量投与された患者における急激な血圧低下や急性炎症反応が相次いで報告され

- <sup>\*1</sup> 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 東京都世田谷区上用賀1-18-1 (〒158-8501)  
 Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1  
 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan
- <sup>\*2</sup> 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部 同上  
 Division of Organic Chemistry
- <sup>\*3</sup> 味の素(株)ライフサイエンス研究所 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 (〒210-8681)  
 Institute of Life Sciences, Ajinomoto Co., 1-1 Suzuki-cho, Kawasaki-ku, Kawasaki, Kanagawa 210-  
 8681, Japan
- <sup>\*4</sup> 沢井製薬(株) 大阪市淀川区宮原5-2-30 (〒532-0003)  
 Sawai Pharmaceutical Co., 5-2-30 Miyahara, Yodogawa-Ku, Osaka 532-0003, Japan
- Corresponding author: Nana Kawasaki, Division of Biological Chemistry and Biologicals, National  
 Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan  
 E-mail: nana@nihs.go.jp

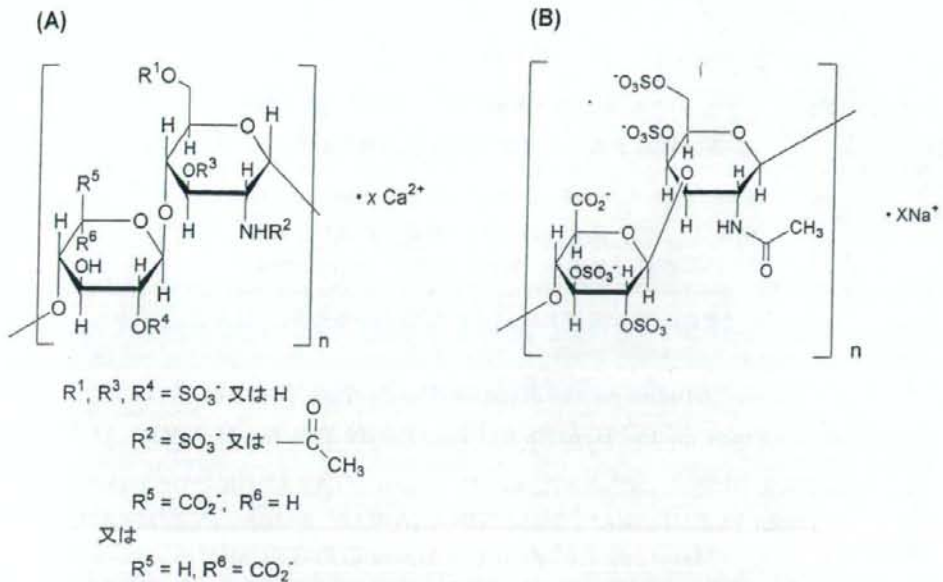


Fig. 1 (A) ヘパリンカルシウム及び (B) OSCS の構造

た、米国食品医薬品庁 (FDA) は、有害事象の原因物質としてヘパリンナトリウムに混入していた過硫酸化コンドロイチン硫酸 (Over-sulfated chondroitin sulfate, OSCS) を特定し (Fig. 1B)<sup>1,2)</sup>、<sup>1</sup>H-NMR 及びキャピラリー電気泳動を用いたヘパリンナトリウム中の OSCS スクリーニング法を公開した<sup>3)</sup>。各国の規制当局及びヘパリン製造メーカーは、直ちに FDA の方法を用いたヘパリンナトリウムの分析を実施し、日本薬局方、米国薬局方及び欧州薬局方も、迅速対応としてヘパリンナトリウム各条における OSCS の限度試験の設定を検討することとなった<sup>4,5)</sup>。同時に各国では、ヘパリンカルシウムや低分子量ヘパリンナトリウム等についても OSCS の限度試験の設定の必要性が検討された<sup>6,7)</sup>。

本研究は、我が国におけるヘパリンカルシウムの品質・安全性確保を目的として、<sup>1</sup>H-核磁気共鳴スペクトル (<sup>1</sup>H-NMR) を用いたヘパリンカルシウム中の OSCS 分析法を開発するとともに、局外規各条ヘパリンカルシウム純度試験としての適用可能性を検証したものである。

## 実験方法

### 1. 試料

OSCS は日本バルク薬品㈱から供与されたヘパリ

ンナトリウムより弱陰イオン交換カラムを接続した HPLC で精製したものをを用いた<sup>8)</sup>。ヘパリンカルシウムは味の素㈱及び沢井製薬㈱から供与されたヘパリンカルシウムを使用した。3-トリメチルシリルプロピオン酸ナトリウム-*d*<sub>4</sub> (TSP; 重水素化率, 98%) は、アルドリッチから購入した。重水は重水素化率 99.9~99.96% のものを使用した。

### 2. 分析条件

ヘパリンカルシウム原薬 20 mg を最終濃度 0.01% (w/v) TSP を含む重水溶液 (TSP 重水溶液) 0.60 mL に溶かして試料溶液とした。この液につき TSP を内部基準物質として日本薬局方一般試験法 NMR (2.21) に従い <sup>1</sup>H-NMR を測定した。温度は 25°C に設定し、スピニングはオフとした。データポイント数は 32,768 とし、スペクトル範囲は DHO のシグナルを中心に  $\pm 6.0$  ppm とした。パルス角は 90°、繰り返しパルス待ち時間は 20 秒、ダミーキャンは 4 回とした。ヘパリンの *N*-アセチル基のプロトンのシグナルの S/N 比が 200 以上得られるまで積算した。ウィンドウ関数は指数関数 (Line broadening factor = 0.2 Hz) を用いた。

### 3. 特異性及び検出感度の評価

ヘパリンカルシウムをTSP重水溶液に溶解してヘパリンカルシウムTSP重水溶液とした(20 mg/0.6 mL)。この液に、最終濃度0.5、1.0、2.0及び10.0% (w/w) OSCSを添加した後、JEOL JNM-ECA 500 (500 MHz)を用いて<sup>1</sup>H-NMRを測定した。TSPのシグナル面積強度に対するOSCSのN-アセチル基に由来するシグナルの相対面積強度を求めた。

### 4. 共同検定

国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部、同有機化学部、味の素(株)、沢井製薬(株)が参加した。ここでは試験室を便宜上A~Dと記す(順不同)。試験室AはVarian MERCURY VX 400 (400 MHz)、試験室BはJEOL JNM-ECA 500 (500 MHz)、試験室CはBruker AVANCE 500 (500 MHz)、試験室DはBruker AVANCE 600 (600 MHz)を使用した。

ヘパリンカルシウムTSP重水溶液に、最終濃度0.5及び10% (w/w)となるようにOSCSを添加して試料溶液(20 mg/0.6 mL)とした。この液につき<sup>1</sup>H-NMRを測定し、OSCS及びヘパリンカルシウムのN-アセチル基のプロトンに由来するシグナルの化学シフト及びS/N比、並びにヘパリンカルシウムのN-アセチル基の<sup>13</sup>Cサテライトピークの化学シフトを求めた。

## 結 果

### 1. 特異性

プロトン共鳴周波数500 MHzの装置を用いてヘパリンカルシウムの<sup>1</sup>H-NMRを測定したとき、ヘパリンカルシウムのN-アセチル基に由来するシグナルは、2.05 ppm付近に観測された(Fig. 2A)。次に、ヘパリンカルシウムに1%のOSCSを添加して<sup>1</sup>H-NMRを測定したところ、OSCSのN-アセチル基に由来するシグナルは2.18~2.19 ppmに観測された(Fig. 2B)。この結果を1% OSCS添加ヘパリンナトリウムのスペクトルと比較したところ、ヘパリンカルシウム中のOSCSのN-アセチル基のシグナルは、ピーク形状がブロードで、化学シフトは低磁場側にシフトしていることが確認された(Fig. 2B及び2C)。

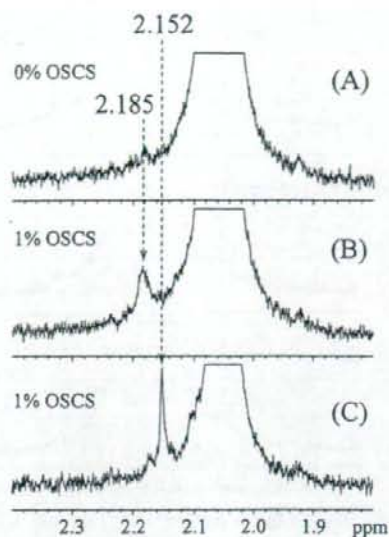


Fig. 2 (A) ヘパリンカルシウム, (B) 1% OSCS 添加ヘパリンカルシウム, 及び (C) 1% OSCS 添加ヘパリンナトリウムの<sup>1</sup>H-NMR スペクトル (1.8~2.4 ppm)

### 2. 検出限界

ヘパリンカルシウムに、ヘパリンナトリウム中のOSCSの検出限界に相当する0.5%のOSCSを添加し、プロトン共鳴周波数500 MHzの装置を用いて<sup>1</sup>H-NMRを測定したとき、OSCSのN-アセチル基に由来するシグナルは、ヘパリンカルシウムのN-アセチル基の<sup>13</sup>Cサテライトピークと重なることが分かった。しかし、0.5% OSCSのシグナル面積強度は、高磁場側に観測される<sup>13</sup>Cサテライトピークのシグナル面積強度に比べて有意に大きいこと、更にデカップリング法により<sup>13</sup>Cサテライトピークを消去して<sup>1</sup>H-NMRを測定した場合でも0.5%のOSCSのN-アセチル基に由来するシグナル(2.185 ppm)を確認できたことから、0.5%のOSCSは検出可能と判断された(Fig. 3)。

### 3. 共同検定

プロトン共鳴周波数400 MHz以上の装置を用いて、3機関4試験室において、0.5及び10.0% OSCSを含むヘパリンカルシウムの<sup>1</sup>H-NMRを測定したところ、ヘパリンカルシウムとOSCSのN-アセチル基に由来するシグナルは、それぞれ2.05 ppm

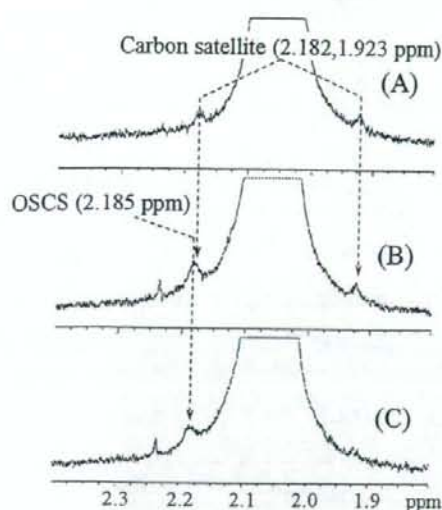


Fig. 3 0.5% OSCSをヘパリンカルシウムに添加したときのOSCSの*N*-アセチル基のシグナル及び<sup>13</sup>C-サテライトピーク

(A) ヘパリンカルシウムのみ (デカップリングなし), (B) 0.5% OSCS添加ヘパリンカルシウム (デカップリングなし), 及び (C) 0.5% OSCS添加ヘパリンカルシウム (デカップリングあり).

付近及び2.18~2.19 ppmに観測された (Table 1). 400, 500及び600 MHzの装置を用いたときの低磁場側の<sup>13</sup>Cサテライトピークの化学シフトは, それぞれ2.212, 2.180~2.182及び2.157~2.158 ppm

であった.<sup>13</sup>CサテライトピークとOSCSのシグナルが重ならない400及び600 MHzを用いた試験室では, 0.5%のOSCSを検出可能と判断した. 500 MHzを用いた2試験室はいずれも<sup>13</sup>CサテライトピークとOSCSのシグナルが重なることを確認したが, 0.5%のOSCSは検出可能と判定した.

#### 考 察

ヘパリンナトリウム純度試験と同様の分析条件により, OSCSを添加したヘパリンカルシウムの<sup>1</sup>H-NMRを測定したところ, ヘパリンとOSCSの*N*-アセチル基に由来するシグナルが2.04~2.05 ppm及び2.18~2.19 ppmと離れた位置に観察された. また, ヘパリンナトリウムの場合と同様に0.5%のOSCSを検出できることが確認された. これらの結果から, <sup>1</sup>H-NMRは, ヘパリンカルシウム中のOSCSの限度試験として応用可能であることが示唆された.

ヘパリンカルシウム中のOSCSの*N*-アセチル基のシグナルの化学シフトの規格として, 米国薬局方では, ヘパリンナトリウムと同様の2.13~2.19 ppmが設定されている. しかし, 日本国内3機関4試験室による共同検定の結果, ヘパリンカルシウム中のOSCSの*N*-アセチル基のシグナルは2.183~2.187 ppmに低磁場シフト (ヘパリンナトリウム, 2.15 ppm付近) することが明らかになった. また, ヘパリンナトリウム中のOSCSに比べて, ヘパリ

Table 1 <sup>1</sup>H-NMRによるヘパリンカルシウム中のOSCSの限度試験の共同検定結果

機関 (装置 MHz)	OSCS (%)	ヘパリンの <i>N</i> -アセチル基		OSCSの <i>N</i> -アセチル基		<sup>13</sup> C-サテライト ピーク (ppm)
		(ppm)	S/N	(ppm)	S/N	
A (400)	0.5	2.054	982	2.185	18	1.893及び2.212
	10	2.052	942	2.184	132	1.893及び2.212
B (500)	0.5	2.053	285	2.183	5*	1.923及び2.182
	10	2.052	291	2.185	64	1.923及び2.182
C (500)	0.5	2.051	287	2.180	5*	1.921及び2.180
	10	2.051	218	2.184	74	1.921及び2.180
D (600)	0.5	2.052	1848	2.187	18	1.943及び2.158
	10	2.052	1442	2.184	525	1.943及び2.157

\* <sup>13</sup>Cサテライトピークを含む

ンカルシウム中のOSCSのシグナルはブロードであることが確認された。したがって、我が国におけるヘパリンカルシウム中のN-アセチル基に由来するシグナルの化学シフトの規格は、幅をもたせた2.13~2.23 ppmとすることが適当であろうと判断された。

OSCSの限度値は、OSCSが有害事象の原因物質であること、製造工程や環境から混入する可能性はないこと、及び目的物質関連物質として混入する可能性もないことから、「2.13~2.23 ppmにOSCSに由来するシグナルを認めないこと」が適当であると考えられる。これは、ヘパリンナトリウム同様、検出限界0.5%程度の限度試験であることを意味する。したがって、システムの検出感度が0.5% OSCSを検出するのに十分であることを確認することが重要である。すなわち、OSCSのTSP重水溶液(0.1 mg/0.6 mL)にOSCSを含まないヘパリンカルシウムを添加して<sup>1</sup>H-NMRを測定したとき、2.02~2.06 ppmと2.13~2.23 ppmにそれぞれヘパリン及びOSCSのN-アセチル基に由来するシグナルが検出されることを確認する必要がある。500 MHzの装置を用いた場合は、<sup>13</sup>C サテライトピークがOSCSのN-アセチル基と同じ位置に検出されることが明らかになったが、デカップリングにより<sup>13</sup>C サテライトピークか否かを確認する必要がある<sup>9)</sup>。

#### 謝 辞

ヘパリンナトリウムをご供与いただきました日本

バルク薬品㈱に深く御礼申し上げます。本研究遂行にご協力いただきました厚生労働省医薬食品局審査管理課鷺田淳専門官、鈴木克之主査、独立行政法人医薬品医療機器総合機構品質管理部基準課上野清美課長、森田 收氏、仁後知子氏にお礼申し上げます。

本研究の一部は厚生労働省の支援によって行われたものである。

#### 文 献

- 1) Guerrini, M., Beccati, D., Shriver, Z., *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, 26(6), 669-675 (2008).
- 2) Kishimoto, T. K., Viswanathan, K., Ganguly, T., *et al.*: *N. Engl. J. Med.*, 358(23), 2457-2467 (2008).
- 3) <http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/heparin/default.htm>.
- 4) [http://www.edqm.eu/medias/fichiers/Heparin\\_sodium\\_monograph\\_Revised.pdf](http://www.edqm.eu/medias/fichiers/Heparin_sodium_monograph_Revised.pdf).
- 5) <http://www.usp.org/hottopics/heparin.html>.
- 6) <http://www.usp.org/pdf/EN/USPNF/revisionBulletinHeparinCalcium.pdf>.
- 7) [http://www.edqm.eu/medias/fichiers/Heparin\\_calcium\\_monograph\\_Revised.pdf](http://www.edqm.eu/medias/fichiers/Heparin_calcium_monograph_Revised.pdf).
- 8) Montgomery, R. I., Lidholt, K., Flay, N. W., *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 89(23), 11327-11331 (1992).
- 9) Yamaguchi, H., Shinagawa, M., Shimba, N., Miyano, H., Suzuki, E.: *Yakugaku Zasshi*, 128(10), 1513-1515 (2008).